KAPA Library Quantification Kit (ライブラリー定量キット)

Applied Biosystems SOLiD™ プラットフォーム向け

クイックガイド

Cat.No	コンポーネント	
KK4823	KK4922	KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit、1×1ml SOLiD™ Primer Premix (10X)
	KK4902	6×80μl SOLiD™ DNA Standards
KK4833	KK4932	KAPA SYBR® FAST ABI Prism® qPCR Kit、1×1ml SOLiD™ Primer Premix (10X)
	KK4902	6×80μl SOLiD™ DNA Standards
KK4872	KK4972	KAPA SYBR® FAST ROX Low qPCR Kit、1×1ml SOLiD™ Primer Premix (10X)
	KK4902	6×80μl SOLiD™ DNA Standards
KK4843	KK4942	KAPA SYBR® FAST Bio-Rad iCycler® qPCR Kit、1×1ml SOLiD™ Primer Premix (10X)
	KK4902	6×80μl SOLiD™ DNA Standards
KK4853	KK4952	KAPA SYBR® FAST LightCycler® 480 qPCR Kit、1×1ml SOLiD™ Primer Premix (10X)
	KK4902	6×80μl SOLiD™ DNA Standards

1. 製品概要

フラグメントライブラリー中の増幅可能な分子数を正確に定量することは、Applied Biosystems SOLiD™次世代シーケンシングプラットフォームのシーケンス結果にとって非常に重要です。ライブラリー濃度を高く見積もった場合、複数のライブラリー分子がエマルジョン内の同一ビーズと結合することになります。またライブラリー濃度を低く見積もった場合、エマルジョンPCRの後にDNAと結合したビーズが少なくなります。どちらのケースも、最適とは言えないシーケンシングキャパシティーとなります。qPCRは増幅可能な分子数を測定するための唯一の技術であることから、DNAライブラリーを正確に定量するための代表的な手法として広く認知されております。qPCRの広いダイナミックレンジによって、極端に希釈されたライブラリーであっても正確に定量することができます（シーケンスキャプチャー実験による増幅されていない配列の溶出液など）。

Applied Biosystems SOLiD™プラットフォーム向けKAPA ライブラリー定量キットには、DNAスタンダード（10倍希釈液 x 6）と10X Primer Premixが付属しており、KAPA SYBR® FASTキットと共に使用することによってSOLiD™ライブラリーの増幅可能な分子数を正確に定量することができます。この154bp SOLiD™ DNAスタンダードは、SOLiD™アダプター配列が両サイドに位置する線状DNAフラグメントで構成されております。キットに付属した6つの10倍希釈DNAスタンダードを用いて得られた検量線によって定量することができます。qPCRベースの正確なライブラリー定量には重要な要素が3つあります。それは (i) 使用するスタンダード溶液の精度と再現性、(ii) qPCRにおいて、アダプターが結合した全ての分子を同じ効率で増幅するためのDNAポリメラーゼの能力 (iii)正確で再現性のあるリキッドハンドリング、の3つです。KAPA SOLiD™ライブラリー定量キットは、ロット間のばらつきを最小限に抑えるための厳しい試験を経ております。それに加え、KAPA SYBR® FAST qPCRキットは、高性能でハイスループットなリアルタイムPCR用として設計されております。このキットには、KAPA独自のスクリーニング法（Molecular Evolution）を通じてSYBR® Green I 色素を用いたqPCR向けにエンジニア加工された全く新しいDNAポリメラーゼが含まれております。KAPA SYBR® FAST qPCRキットは、ATリッチとGCリッチなターゲットそして最長1kbまでのフラグメントを非常に効率的に増幅できるため、ライブラリー定量アプリケーションに理想的なキットです。ご使用しているqPCR装置に対応したキットのバージョンをお選びください。

このテクニカルデータシートでは、KAPA SYBR® FAST qPCRキットを用いたSOLiD™ライブラリー定量のワークフローおよびプロトコルを解説いたします。

● 保存

全てのコンポーネントを-20℃で保存してください。

クイックノート

- qPCR反応のセットアップの前に、1mlのSOLiD™ Primer Premixを5mlボトルに入ったKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix(2X)に加え、10秒間ボルテックスミキサーで撹拌します。
  Primer Premixをボトルに加えた日付を記録します。20μlのqPCR反応にKAPA SYBR® FAST/Primer Premix溶液12μlを使用します。
- 20μl反応あたり、4μlの希釈ライブラリー DNAまたはDNAスタンダードを使用します。
- 使用するqPCR装置に対して正しいバージョンのキットを使用していること確認します。qPCR装置やリファレンスダイの適合性についての詳細は、KAPA SYBR® FASTのテクニカルデータシートをご参照ください。
- 正確な結果を得るためにも、全てのコンポーネントを使用前にしっかりと融解・撹拌します。
- ライブラリー定量を成功させるためには、ライブラリーDNAを正確に希釈することが非常に重要ですので、精度の高いペッティングを常に心がけてください。
- このプロトコルの所要時間は2時間30分です。しかし、使用するqPCR装置によってその時間は異なり、2時間程度で完了することもあります。

2. アプリケーション

KAPA SOLiD™ライブラリー定量キットは、下記のライブラリーの定量に適しております：

- 以下のPCRプライマー配列を含んだABI SOLiD™アダプターで構築されたライブラリー
  Primer P1：5'-CCA CTA CGC CTC CGC TTT CCT CTC TAT G- 3'
  Primer P2：5'-CTG CCC CGG GTT CCT CAT TCT- 3'
- 濃度のレンジが広いライブラリー
- GC含量のレンジが広いフラグメント含むライブラリー
- 長さのレンジが50～1,000bpのフラグメントを含むライブラリー

3. ワークフロー

1mlのSOLiD™ Primer Premix (10X)を5mlのKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X)ボトルに加え、よく混合します。
qPCR Master Mixのボトルに、プライマーを加えた日付を明記してください。

ライブラリー DNAを、10mM Tris-HCl (pH8.0) + 0.05%のTween20で希釈します。
オプションの追加希釈　1：20,000 、1：40,000および1：80,000

Primer Premixを含むKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	12 μl
PCR用精製水	4 μl
希釈したライブラリー DNAまたはDNAスタンダード (1 ～ 6)	4 μl
合計	20 μl

初期活性化/初期変性	95℃	5分間	
変性	95℃	30秒間	35サイクル
アニーリング/伸長/データ取得	60℃	45秒間	

注：融解分析 (融解曲線) は必要ありません。

スタンダードに対する反応効率が90 ～ 110%であることを確認します。
ライブラリーに対する反応効率が90 ～ 110%であることを確認します。(オプション)

154bpのDNAスタンダードに対する絶対定量を行います。

*使用するqPCR装置に依存します。qPCRの運転時間は約55分まで短くすることが可能です。

4. 詳しいプロトコル

概要

- qPCR反応をセットアップする前に、1mlのPrimer Premix (10X)を5μlのKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X)ボトルに加え、ボルテックスミキサーで10秒間撹拌します。**Primer Premixを加えた日付をボトルに記載しておきます。**
- このプロトコルは20μlのqPCR反応用に設計されております。
- 全てのコンポーネントは、完全に融解させて十分に撹拌してから使用してください。
- **オプション：**ライブラリー DNAの希釈には、10mM Tris-HCl (pH8.0) + 0.05%Tween20を推奨します。これによりDNAがプラスチックに吸着することを軽減できるため精度が向上します。この溶液はキットに付属しておりません。

ステップ1：ライブラリーサンプルの調製

ライブラリー希釈バッファー (pH8.0で10mM Tris-HCl (pH8.0) + 0.05%Tween20；キットに付属せず) を使って精製したライブラリーを1：10,000に希釈します。10秒間ボルテックスで撹拌して完全に混合します。1：10,000希釈サンプルは次のようにして調製できます。

ライブラリー希釈バッファー	10 ml
ライブラリー DNA	1 μl
合計	10 ml

- **オプション：**Agilent Bioanalyzerアッセイまたはそれと同等の手法を用いて、平均サイズ分布とDNAライブラリーのクオリティーを決定してください。
- **推奨：**1：10,000希釈ライブラリー DNAサンプルを更に3回、2倍希釈します。例えば、100μlの1：10,000希釈ライブラリーDNAサンプルを100μlのライブラリー希釈バッファーに加えて、1：20,000希釈ライブラリー DNAサンプルを調製します。10秒間ボルテックス撹拌して完全に混合します。この作業を繰り返して、1：40,000および1：80,000希釈ライブラリーDNAサンプルを調製します。

  注意：この追加の希釈作業は、高濃度のライブラリーについて実施します。これによって、4種類の希釈ライブラリー DNAサンプルのいずれかが、KAPA Library Quantification (カパライブラリー定量) キットの付属品であるスタンダードのダイナミックレンジ内に入るようになるでしょう。この希釈作業によって、ピペッティング操作の正確性および／またはライブラリー qPCRの効率についても知ることができ、更にはトラブルシューティングに役立てることもできます。

ステップ2：実験デザイン

キットには6濃度のDNAスタンダードが入っております。このDNAスタンダードは、1枚のqPCRプレートに3セット配置しなければなりません。DNAスタンダードに加え、各DNAライブラリーについて、合計で少なくとも12の反応液が必要となります。(1：10,000希釈ライブラリーの3連測定に加えて、1：20,000、1：40,000および1：80,000のそれぞれについて3連測定します)。

ステップ3：qPCR試薬

次の試薬が完全に融解し、ボルテックスで撹拌によって完全に混合していることを確認します。

- 1mlの10X SOLiD™ Primer Premixを1ml加えた2X KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (5ml)
- 6濃度のDNAスタンダード（キット付属の10倍連続希釈液）
- ライブラリー DNAの1：10,000希釈サンプルおよびオプションの同ライブラリー DNAの1：20,000、1：40,000および1：80,000の連続希釈サンプル

ステップ4：qPCRセットアップ

6濃度のスタンダードと各ライブラリー希釈サンプルについてqPCR反応液を3連測定分用意しなければなりません。qPCRプレートの各ウェルに**合計反応量20μl**になるように次のものを加えます。qPCRプレートをシールで確実に密封します。プレートをゆっくり混合した後、短時間遠心分離にかけて全てのコンポーネントをウェルの底に集めます。

Primer Premixを含むKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	12 μl
PCR用精製水	4 μl
希釈したライブラリー DNAまたはDNAスタンダード（1～6）	4 μl

ステップ5：qPCRサイクル

プレートを適正なリアルタイムサーモサイクラーに設置します。qPCRプロトコルをプログラムします。

初期活性化/変性	95℃	5分	
変性	95℃	30秒	35サイクル
アニーリング/伸長/データ収集	60℃	45秒	

注意：解離分析（融解曲線）は必要ありません。

4. 詳しいプロトコル（続き）

ステップ6：分析

6.1　データ分析の前に、qPCR装置のガイドラインに従ってDNAスタンダードに注釈をつけます。

サンプル名[1]	DNA濃度（pg/μl）[2]
Std 1	10
Std 2	1
Std 3	0.1
Std 4	0.01
Std 5	0.001
Std 6	0.0001

1：1反応あたり4μlのDNAスタンダード（キット付属）を用いて、各スタンダードを3連でアッセイなければなりません。

2：スタンダード量の欄に正しいDNA濃度（pg/μl）を入力します。上の表の濃度は、キット付属のSOLiD™ DNAスタンダードの濃度です。qPCR(4μl)に加えられた希釈ライブラリー DNAの量は、そのqPCRにおける各DNAスタンダードの量と同じであるため、反応液のDNA濃度を算出する必要はありません。

6.2　DNAスタンダードの希釈シリーズについて計算した反応効率が、90 ～ 110%の範囲内に入ることを確認します。

6.3　**オプション：**2倍ライブラリー DNA希釈シリーズ（使用している場合）について計算した反応効率が90 ～ 110%の範囲内に入ることを確認します。

6.4　各ライブラリーの濃度を、次の例で示すように計算します。：

a. 正確に注釈をつけたDNAスタンダード1 ～ 6のqPCRの結果により、1：10,000倍希釈ライブラリーの濃度（および1：20,000、1：40,000、1：80,000の濃度）を計算します。

b. 未希釈のライブラリーの濃度を、該当する希釈係数(10,000、20,000、40,000または80,000)を考慮に入れて計算します。

ライブラリー名	qPCR装置で算出した濃度（pg/μl）（3連測定データポイント）			平均濃度（pg/μl）	保存ライブラリーの濃度（pg/μl）
ライブラリー 1:10,000	A1	A2	A3	A	A x 10,000
ライブラリー 1:20,000	B1	B2	B3	B	B x 20,000
ライブラリー 1:40,000	C1	C2	C3	C	C x 40,000
ライブラリー 1:80,000	D1	D2	D3	D	D x 80,000

6.5　DNAスタンダードのダイナミックレンジ内にある最も高濃度のライブラリー DNA希釈液サンプルに対応する3連測定データポイントを平均して、未希釈ライブラリーの濃度を計算します。データポイントの1つが大きく外れている場合は、このデータポイントを外して計算することができます。2点以上のデータポイントが大きく外れている場合には、アッセイをやり直してください。

6.6　未希釈ライブラリーについて計算された濃度を利用して、適切な希釈率のライブラリーサンプルを調製しemPCRに用います。

5. トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	解決策
反復データポイントにおける再現性が乏しい。	ピペッティングが不正確	リキッドハンドリングシステムに関する取扱説明書を確認する。マニュアルピペットを使用している場合は以下のポイントを確認する。 ➢ 斜めにピペッティングをしない。 ➢ 正しい量が吸引できているかどうか、排出する前にチップを確認する。 ➢ チューブまたはウェルの底から吸引する。 ➢ 排出後のチップに残留液が無いことを確認する。 ➢ チューブまたはウェルの側面にチップが触れないようにする。
増幅曲線で、第1スタンダードのスペースがその他5つのスタンダードのスペースと一貫していない。	qPCR装置によって自動ベースライン決定の設定が異なるため、第1DNAスタンダードのCTスコアが誤って算出されることがある。	以下のどれかを試してみる： ➢ 検量線を描く際に、6つのDNAスタンダードの第1スタンダードを除外する。 ➢ 最も濃度の高いDNAスタンダードに対応するデータポイントをリカバーするためには、どのようにしてマニュアルでベースラインを設定するかをqPCRの取扱説明書で確認する。
第1DNAスタンダード（最も濃度が高い）の増幅の前に、1:10,000ライブラリー希釈液の増幅が起きる。	ライブラリーの濃度が高い。	未希釈ライブラリーの初期希釈の割合を増やす（1:100,000など）。その後、必要に応じて2倍の段階希釈を行う。
qPCR増幅曲線で産物が確認できない。またはqPCR産物をアガロースゲルで解析した際に産物が確認できない。	➢ プロトコルで定められた手順に従っていない。 ➢ 反応セットアップの前にPrimer PremixをqPCRマスターミックスに加えていない。	全てのステップが正しく行われ、試薬、希釈液、量、検知フォーマット、サイクルパラメーターに誤りがないかを確認する。
qPCR増幅曲線では産物が確認できないが、qPCR反応生成物をアガロースゲルで解析した際には確認できる。	➢ KAPA SYBR® FASTのキットバージョンの選択を間違っている。 ➢ 検出器の選択を間違っている。	➢ 使用しているqPCR装置にあったキットバージョンを選択する。 ➢ 正しい検出器を使用しているか確認する。また（該当する場合）、特定のqPCR装置に対して正しいリファレンス蛍光色素を選択して使用しているか確認する。
蛍光強度が低い。	➢ KAPA SYBR® FAST qPCRマスターミックスの使用方法が誤っている。 ➢ リファレンスダイの濃度が誤っている。	➢ SYBR® Green I色素は光に敏感なため、光への曝露を避ける。 ➢ 使用するqPCR装置に合ったキットを選択しているか確認する。 ➢ ROXリファレンスダイの濃度が正しいかどうかを確認する。
テンプレートを含まないコントロール（NTC）で陽性シグナルが検出される。	コンタミネーションした試薬がある。	qPCR反応液を調製する際は、コンタミネーションを防ぐための予防措置を講じる。増幅反応液のセットアップは、DNAフリーの環境下でエアロゾルバリアーチップを用いて行うのが理想的です。もしNTCサンプルのCTスコアが希釈ライブラリーのCT値よりも大幅に高く、DNAスタンダードが描く検量線のクオリティーに影響しないのであれば、解析を進めることが可能です。
算出したライブラリー濃度とシーケンシング結果のクオリティーとの相関関係が低い。	➢ ピペッティングが不正確 ➢ クラスター生成ワークフローにばらつきがある。	➢ 正確なピペッティングのための注意点を確認する（前項のトラブルシューティングを参照） ➢ Applied Biosystems SOLiD™の取扱説明書を確認する。

Genetics 日本ジェネティクス株式会社 http://www.n-genetics.com
本　社：〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目4番14号 後楽森ビル18F Tel. 03（3813）0961 Fax. 03（3813）0962
西日本営業所：〒604-8277 京都府京都市中京区西洞院通御池下ル565番地 ラフィーネ御池3F Tel. 075（257）5421 Fax. 075（257）5422

2013年11月現在のものです。製品は改良のため予告なく変更する場合があります。10P1107